基础研究

硫利达嗪诱导SW480细胞凋亡的机制

刘金坤[1],郝亚娟[1],黄嘉维[1],李 欣[2],蔡红兵[1],彭 康[1]
南方医科大学[1]中医药学院分子生物学实验室,[2]肿瘤研究所,广东 广州 510515

摘要:目的 研究硫利达嗪对结肠癌SW480细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 应用5~30 μmol/L硫利达嗪处理SW480细胞,MTT法检测细胞增殖抑制率;Hoechst33342细胞核染色法观察细胞凋亡的形态学改变;流式细胞仪检测细胞凋亡率、细胞周期;RT-qPCR分析PDCD4、c-MYC、BCL2、CCND1、CASPASE3、PARP1、CDK4、EIF4A基因表达水平;Western blotting检测AKT、p-AKT、PDCD4蛋白表达水平。**结果** MTT结果表明硫利达嗪抑制SW480细胞的增殖,硫利达嗪处理细胞后出现核固缩、染色质凝集和核碎片化等典型的细胞凋亡特征;流式检测表明硫利达嗪诱导G_0/G_1期阻滞,细胞凋亡增加。RT-PCR结果表明硫利达嗪处理细胞后PDCD4表达上调,CCND1、CDK4、c-MYC、BCL2、CASPASE3、PARP1和EIF4A表达下调。免疫印迹分析结果显示PDCD4蛋白表达上调,p-AKT蛋白表达下调。**结论** 硫利达嗪能够抑制人结肠癌SW480细胞的增殖,并诱导其凋亡,其机制可能与抑制PI3K/AKT信号通路导致PDCD4表达水平升高有关。
关键词:结肠癌;SW480;硫利达嗪;细胞凋亡

Mechanism of thioridazine-induced apoptosis of human colorectal cancer SW480 cells

LIU Jinkun[1], HAO Yajuan[1], HUANG Jiawei[1], LI Xin[2], CAI Hongbing[1], PENG Kang[1]
[1]Laboratory of Molecular Biology, School of Traditional Chinese Medicine, [2]Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the effect of thioridazine on the proliferation and apoptosis of human colorectal cancer SW480 cells. **Methods** SW480 cells were treated with different concentrations of thioridazine, and MTT assay was used to evaluate the cell inhibition rate. Hoechst 33342 staining was performed to demonstrate the cell morphology changes. Flow cytometry was used to determine the cell apoptosis and cell cycle changes. RT-qPCR was used to detect PDCD4, c-MYC, BCL2, CCND1, CASPASE3, PARP1, CDK4 and EIF4A mRNA expressions, and Western blotting was employed to assay AKT, p-AKT, and PDCD4 protein expression levels. **Results** MTT results showed that thioridazine inhibits the proliferation of SW480 cells. SW480 cells treated with thioridazine presented with such typical features of apoptosis of karyopyknosis, chromatin condensation and nuclear fragmentation. Flow cytometry showed that thioridazine was a cell cycle-specific drug and caused cell cycle arrest at G_1/G_0 phase and an increased cell apoptosis rate. Thioridazine treatment of the cells resulted in up-regulated PDCD4 mRNA expression and down-regulated mRNA expressions of CCND1, CDK4, c-MYC, BCL2, CASPASE3, PARP1 and EIF4A, increased PDCD4 protein expression and reduced p-AKT protein expression. **Conclusion** Thioridazine inhibits the proliferation and induces apoptosis of SW480 cells by up-regulating PDCD4 and inhibiting PI3K/Akt pathway.
Key words: colon cancer; SW480; thioridazine; apoptosis

结肠癌是西欧、北美等发达国家最常见的恶性肿瘤,在过去30多年的时间里,结肠癌发病率呈上升趋势。结肠癌多见于中老年人,30~69岁占绝大多数,男性多于女性,发病率占胃肠道肿瘤的第3位,主要为腺癌、黏液腺癌、未分化癌。结肠癌的发病与社会环境、生活方式(尤其是饮食习惯、缺乏体力活动)、遗传因素有关。年龄、结直肠息肉史、溃疡性结肠炎及胆囊切除史也是结肠癌的高危因素[1]。

硫利达嗪(Thioridazine)是哌啶类治疗精神疾病的药物,可以通过靶向大脑中的多巴胺受体,来治疗精神障碍所致焦虑和紧张,广泛应用于精神分裂症、躁狂症的治疗[2]。据报道,Thioridazine选择性靶向白血病肿瘤干细胞,但对正常造血干细胞没有影响,可能是拮抗白血病肿瘤干细胞的多巴胺受体[3-4]。PDCD4作为肿瘤抑制和凋亡基因,定位于染色体10q24,PDCD4蛋白由469个氨基酸组成,包含N-末端结构域、C-末端结构域和2个保守的α螺旋MA-3结构域[5]。PDCD4基因通过调控BCL2和c-MYC介导的PI3K/AKT和JNK/C-Jun途径抑制鼻咽癌细胞增殖[6]。PDCD4基因参与细胞凋亡调控,发挥抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移作用。然而,

收稿日期:2014-12-19
基金项目:国家自然科学基金(81372895);广东省自然科学基金(S2013010014275)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81372895).
作者简介:刘金坤,在读硕士研究生,E-mail: liujinkun007@163.com
通信作者:蔡红兵,副研究员,硕士生导师,E-mail: chbing2008@126.com;彭 康,教授,主任医师,博士生导师,E-mail: pkang12@fimmu.com

PDCD4基因在肿瘤发生中的详细作用机制尚不清楚[5]。

近年来文献报道Thioridazine对多种肿瘤细胞有杀伤作用[7-10]，但对结肠癌细胞及PDCD4基因的影响尚未见报道。本研究以SW480细胞作为研究对象，观察Thioridazine对结肠癌细胞凋亡的影响，同时检测BCL2、CCND1、CASPASE3 mRNA及AKT、p-AKT和PDCD4蛋白的变化，进一步阐明其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

HyClone RPMI 1640培养基，胎牛血清（Fetal bovine serum，FBS）均购自General Electric公司，人抗兔AKT、p-AKT（Ser 473）购自Cell Signaling公司，PDCD4抗体、GAPDH抗体和HRP标记的羊抗兔二抗购自Proteintech公司，细胞周期检测试剂盒和Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自BestBio公司，PrimeScrip™RT-PCR和SYBR® Taq™ II试剂盒购自Takara公司。Thioridazine和其他化学药物购自Sigma公司。

1.2 细胞培养

人结肠癌SW480细胞由南方医科大学肿瘤研究所保存。细胞接种于10% FBS的RPMI 1640培养基，5% CO_2、37 ℃适当湿度的细胞培养箱中培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞活力测定

MTT测定Thioridazine处理后细胞存活率。将SW480细胞接种于含10% FBS的RPMI 1640培养基，细胞以2.5×10^3 cells/well密度接种于96孔培养板。铺板24 h后，不同浓度的Thioridazine（0、5、10、15、20、25和30 μmol/L）加入到各孔中，继续培养24 h。然后取20 μl MTT溶液（Sigma，5 mg/ml）加入到每个孔中。37 ℃培养4 h，小心吸取上清，再加入150 μl DMSO振荡器振荡摇匀10 min，酶标仪490 nm测吸光度A值（A_{490}）。计算细胞存活率(%)=(实验组A_{490}-空白组A_{490}/阴性对照组A_{490}-空白组A_{490})×100%，重复3次。

1.4 细胞凋亡检测

Thioridazine作用24 h后，吸去培养液，用PBS清洗2次，加入40 g/L的多聚甲醛液固定10 min后，吸去固定液，以PBS清洗1次，加入5 mg/L的Hoechst33342，染色10 min，用PBS清洗3次后，自然干燥，在尼康TE2000倒置荧光显微镜下以340 nm激发光观察细胞凋亡形态并随机拍照。实验重复3次。

消化、离心收集SW480细胞，用冷PBS洗涤细胞2次。用400 μl 1×Binding Buffer悬浮细胞，浓度约为1×10^6/ml。在细胞悬浮液中加入5 μl Annexin V-FITC，轻轻混匀后于2~8 ℃避光条件下孵育15 min。加入10 μl PI后轻轻混匀于2~8 ℃避光条件下孵育5 min，流式细胞仪（BD Biosciences公司）分析。

1.5 细胞周期分析

SW480细胞3×10^5/ml密度铺板，Thioridazine（20 μmol/L）处理24 h后，将约1×10^6细胞移入离心管中，1000 r/min离心5 min，弃去上清后，用PBS溶液清洗1次，在离心管中留约0.5 ml PBS，加入75%冰乙醇2 ml混匀固定，4 ℃过夜。检测时，离心去乙醇，PBS清洗1次，在离心管中留1 ml PBS，加入Rnase 5 μl（10 mg/ml），37 ℃放置30 min，加入PI（100 μg/ml）染液5 μl，室温避光染色15 min，流式细胞仪检测细胞周期时相和凋亡情况，每个实验重复3次。

1.6 RT-qPCR实验

使用TRIzol（Invitrogen，Life Technologies，USA）裂解各组细胞，提取总RNA。参照Takara逆转录试剂盒配置20 μl反应液，Biometra梯度PCR仪扩增：37 ℃、15 min，85 ℃、5 s，反转录合成cDNA。采用SYBR®Premix Ex Taq™ II试剂盒，Agilent Mx3005P™（Agilent Technologies，Inc.）荧光定量PCR仪进行扩增，条件为95 ℃、5 s，60 ℃、0.5 min，45个循环（引物序列如表1）。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Primer name	Primer sequences
GAPDH Forward	CCATGTTCGTCATGGGTGTGAACCA
GAPDH Reverse	GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC
PDCD4 Forward	ATGATGTGGAGGAGGTGGATGTG
PDCD4 Reverse	CCAATGCTAAGGATACTGCCAAC
BCL2 Forward	GGTGGGGTCATGTGTGTGG
BCL2 Reverse	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC
c-MYC Forward	GGACGACGAGACCTTCATCAA
c-MYC Reverse	CCAGCTTCTCTGAGACGAGCTT
EIF4A Forward	ATGGCACTAGGAGACTACATGG
EIF4A Reverse	CCACGGCTTAACATTTCGTCA
PARP1 Forward	CGGAGTCTTCGGATAAGCTCT
PARP1 Reverse	TTTCCATCAAACATGGGCGAC
CDK4 Forward	TTCGTGAGGTGGCTTTACTG
CDK4 Reverse	GATATGTCCTTAGGTCCTGGTCT
CASPASE3 Forward	CATGGAAGCGAATCAATGGACT
CASPASE3 Reverse	CTGTACCAGACCGAGATGTCA

1.7 免疫印迹分析表1引物序列

Thioridazine处理SW480细胞24 h后，PBS洗涤2次，加入适量RIPA强裂解液（Leagene Biotech公司）和相关磷酸酶、蛋白酶抑制剂（南京凯基公司），冰浴30 min，刮取总蛋白，4 ℃超声后，12 000 r/min离心15 min取上清，BCA法测定蛋白浓度。10% SDS-聚丙烯酰胺

凝胶电泳,湿转至PVDF膜,3% BSA封闭,一抗4 ℃过夜孵育,TBST洗膜3次,5 min/次,孵育二抗,洗膜后ECL发光液(Cwbio公司)曝光,ChemiDocTMXRS+成像仪(Bio-Rad公司)检测并保存结果。Image Lab software 3.0.1软件扫描所得条带,计算目的蛋白与GAPDH的灰度比值。

1.8 统计分析

使用SPSS 20.0软件进行统计分析,t检验用于两个独立组的比较,单因素方差分析来确定不同群体之间的统计学意义,P<0.05为有统计学差异。

表2 MTT实验结果

Tab.2 MTT assay for evaluating the effect of thioridazine exposure on SW480 cell viability (*Mean±SD*, *n*=3)

Thioridazine concentration (μmol/L)	SW480 cell viability (%)
0 (Control)	100.042±3.563
5	81.831±11.427*
10	71.166±10.529**
15	67.420±3.746**
20	56.388±10.280**
25	45.540±5.140**
30	23.687±1.514**

*P<0.05, **P<0.01 *vs* control group.

2 结果

2.1 Thioridazine对细胞活性的影响

Thioridazine(0、5、10、20、25、30 μmol/L)处理SW480细胞24 h后,Thioridazine抑制SW480癌细胞的细胞增殖效果见表2。随着浓度的不断增加,SW480细胞的存活率明显降低,5 μmol/L浓度时细胞存活率为(81.831±11.427)%,SW480细胞增殖受到抑制。20 μmol/L浓度时细胞存活率为(56.388±10.280)%,与空白对照组[(100.042±3.563)%]相比,具有显著性差异(P<0.05)。采用20 μmol/L浓度进行后续的试验分析。

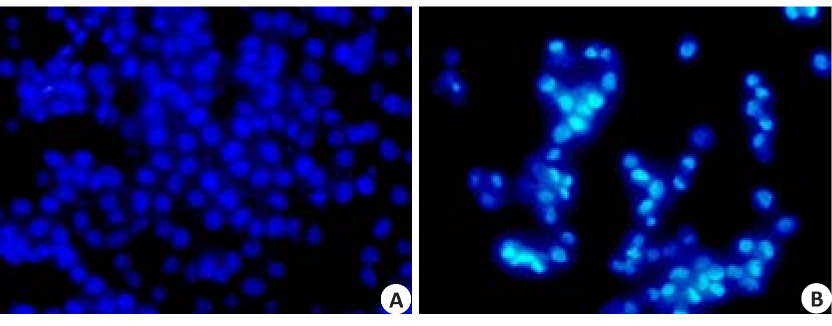


图1 SW480细胞形态学变化

Fig.1 Morphology of SW480 cells under inverted microscope (Original magnification: ×400). *A*: Control group; *B*: Thioridazine (20 μmol/L, 24 h).

2.2 细胞凋亡分析

Thioridazine 20 μmol/L处理24 h后,处理组与对照组相比,细胞收缩变圆,数目明显减少。Hoechst33342细胞核染色结果显示,部分细胞出现核固缩、染色质凝集和核碎片化等典型的细胞凋亡特征,而对照组细胞核膜完整,核呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀,细胞核为蓝色均匀淡染,未见凋亡细胞(图1)。流式细胞仪采用AnnexinV-FITC/PI分析细胞凋亡,如图2,Thioridazine 20 μmol/L处理24 h后,SW480细胞早期凋亡比例为(3.63±1.38)%,晚期凋亡比例为(21.17±1.93)%,具有明显差异(P<0.01)。荧光定量结果显示CASASE3 mRNA表达水平降低(图3),以上结果表明Thioridazine可诱导SW480细胞凋亡。

2.3 Thioridazine诱导G_0/G_1期细胞周期阻滞

Thioridazine可诱导SW480细胞发生G_0/G_1期阻滞(图4),SW480细胞用Thioridazine处理后G_0/G_1期细胞为(52.893±8.175)%,与对照组的(33.670±2.879)%相比,细胞数目显著升高。荧光定量结果显示CCND1 mRNA表达水平降低(图3)。这些结果表明,Thioridazine影响DNA复制而导致细胞周期阻滞于G_0/G_1期,随后诱导细胞凋亡。

2.4 RT-qPCR分析相关基因的表达

PCR结果显示20 μmol/L Thioridazine处理SW480细胞24 h后,PDCD4基因高表达,c-MYC、BCL2、CCND1、CASPASE3、PARP1、CDK4和EIF4A基因表达水平降低(P<0.05,图3)。

2.5 Western blot结果

Thioridazine(20 μmol/L,24 h)处理SW480细胞,PDCD4蛋白明显高表达,AKT蛋白表达没有发生明显变化,但是p-AKT蛋白在给药组表达水平明显降低(P<0.05,图5)。

3 讨论

Thioridazine已被报道具有抗增殖活性的肿瘤细胞包括人卵巢癌细胞[7]、人神经母细胞瘤[8]、人肝癌HepG2细胞[9]、人乳腺癌癌细胞[10-11]、人宫颈癌和子宫内膜癌的细胞[12]、DLBCL细胞系[13]、人肾癌Caki细胞[14]、人胃癌NCI-N87和AGS细胞[15]等。一系列相关的研究表明,Thioridazine可能通过抑制PI3K/AKT信号通路发挥其抗肿瘤的作用。

PI3K/AKT信号通路在人类肿瘤的生理功能中起关键作用,涉及细胞生长、存活到促进血管生成的众多过程[16-17]。Thioridazine能够抑制PI3K/AKT信号通路[12],PDCD4基因位于PI3K/AKT信号通路的下游,因此我们决定研究Thioridazine对SW480细胞PI3K/AKT信

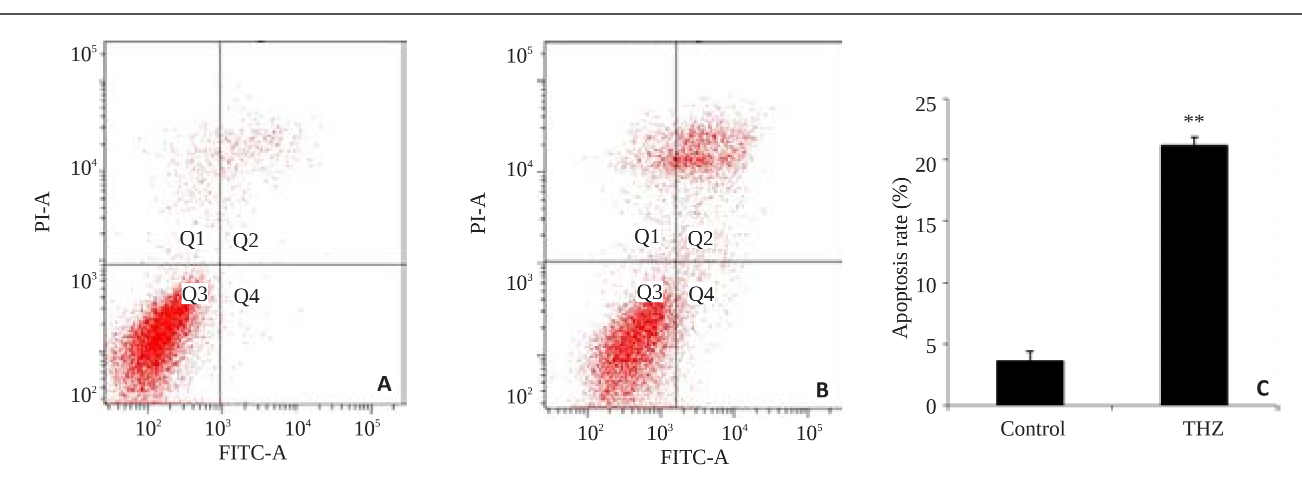


图2 Thioridazine 20 μmol/L作用24 h对SW480细胞凋亡率的影响

Fig.2 Apoptotic rate of SW480 cells incubated with 20 μmol/L of thioridazine for 24 h. *A*: Control group; *B*: Cells treated with 20 μmol/L thioridazine for 24 h. *C*: Data statistics of *A* and *B*. ***P*<0.01 *vs* control group.

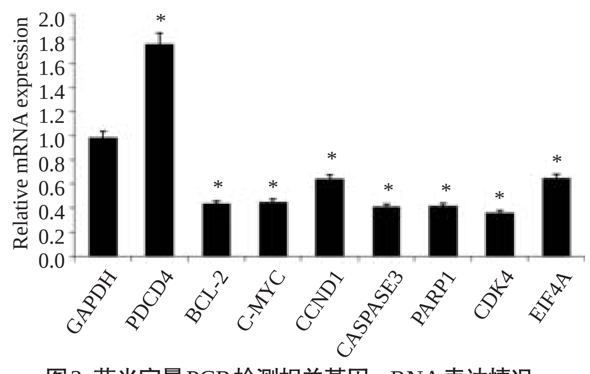


图3 荧光定量PCR检测相关基因mRNA表达情况

Fig.3 Relative mRNA expression detected by fluorescent real-time PCR in SW480 cells. **P*<0.05, ***P*<0.01 *vs* control group.

号通路及PDCD4的影响。荧光定量与免疫印迹分析表明Thioridazine诱导PDCD4 mRNA、蛋白水平表达升高，抑制AKT蛋白的磷酸化。AKT抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶家族成员的活化，而抑制AKT磷酸化可直接抑制CASPASE3，从而诱导细胞凋亡。这是首次在结肠癌细胞中证明了Thioridazine能够调控PDCD4基因高表达，是诱导SW480细胞凋亡的通路之一，说明Thioridazine诱导肿瘤细胞凋亡存在新的机制。

Thioridazine通过G_0/G_1期细胞周期阻滞，从而抑制SW480细胞增殖和诱导细胞凋亡。细胞周期蛋白CCND1的水平对细胞周期G_1/S的转换至关重要，GSK3β通过磷酸化作用促进泛素介导的CCND1的降

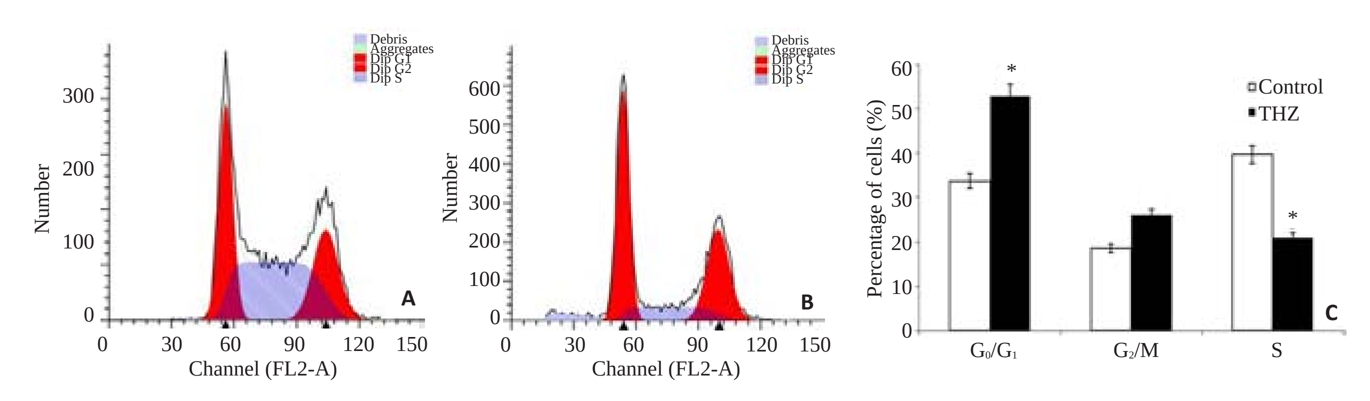


图4 20 μmol/L Thioridazine作用24 h对SW480细胞周期的影响

Fig.4 Cell cycle changes of SW480 cells incubated with 20 μmol/L of thioridazine for 24 h. *A*: Control group; *B*: Cells treated with 20 μmol/L thioridazine for 24 h; *C*: Data statistics of *A* and *B*. **P*<0.05 *vs* control group.

解，抑制AKT磷酸化可以激活GSK3β激酶从而促进CCND1的降解[18]。在肿瘤细胞中PDCD4诱导p21高表达，导致CDK4降低，我们观察到Thioridazine显著抑制CDK4的表达，从而抑制细胞增殖[12]。活化的AKT通过磷酸化作用激活下游靶蛋白c-MYC和BCL2，进而调节细胞的增殖。Thioridazine能够抑制p-AKT，导致PI3K/AKT信号通路下游的PDCD4高表达。而PDCD4又能通过抑制c-MYC和BCL2 mRNA的表达，抑制细胞的增殖[6]，这与荧光定量PCR的分析结果一致。有研究表明，PDCD4可能在转录、翻译和信号转导途径中通过抑制转录阻遏基因EIF4A，从而调节蛋白质的合成，最终抑制了细胞的增殖，诱导肿瘤细胞的凋亡[19-20]。荧光定量PCR结果显示，Thioridazine处理SW480细胞后，与对照组相比EIF4A mRNA表达水平降低。可见，

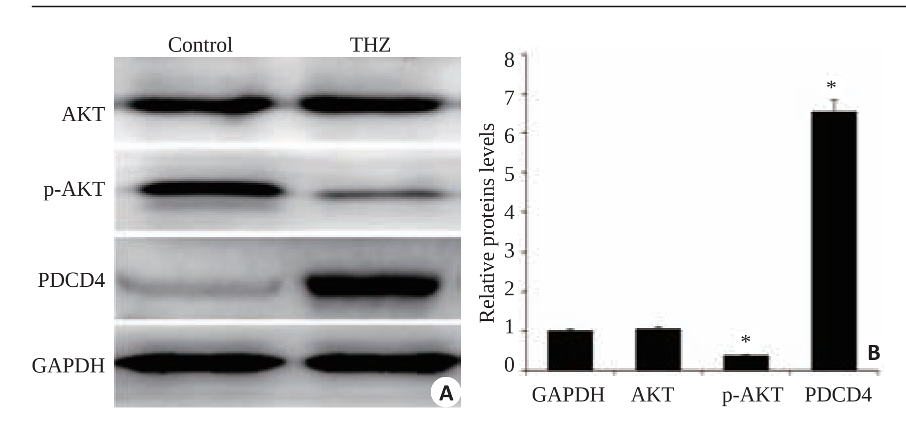


图5 Thioridazine作用后SW480细胞AKT、p-AKT和PDCD4蛋白表达水平变化

Fig.5 Expression AKT, p-AKT and PDCD4 in SW480 cells after thioridazine treatment. ***A***: The bands of Western bloting; ***B***: Ratio of the expression of AKT, p-AKT and PDCD4. **P*<0.05, ***P*<0.01 *vs* control group.

Thioridazine能够抑制PI3K/AKT信号通路，以及调控下游多个相关基因，细胞周期阻滞在G_0/G_1期，从而抑制SW480细胞增殖，诱导细胞凋亡。

PDCD4在肿瘤中显著下调，与患者不良预后相关。已经有应用Thioridazine成功治疗的宫颈癌患者病例报告[21]，Thioridazine的抗癌作用通过小鼠模型已经在体内得证实[22]。本文研究揭示了Thioridazine诱导细胞凋亡一种新机制，鉴于抑制miR-21的表达可使PDCD4表达水平升高[23]，因此我们猜测Thioridazine抑制SW480细胞生长机制可能与miR-21的表达水平降低相关，这还需要进一步的研究证明。

参考文献：

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Weingarten JC, Thompson TL. The effect of thioridazine on prolactinoma growth in a schizophrenic man: case report[J]. Gen Hosp Psychiatry, 1985, 7(4): 364-6.

[3] Sachlos E, Risueño RM, Laronde S, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells[J]. Cell, 2012, 149(6): 1284-97.

[4] Ke XY, Lin Ng VW, Gao SJ, et al. Co-delivery of thioridazine and doxorubicin using polymeric micelles for targeting both cancer cells and cancer stem cells[J]. Biomaterials, 2014, 35(3): 1096-108.

[5] Lankat-Buttgereit B, Göke R. The tumour suppressor Pdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation[J]. Biol Cell, 2009, 101(6): 309-17.

[6] Zhen Y, Liu Z, Yang H, et al. Tumor suppressor PDCD4 modulates miR-184-mediated direct suppression of C-MYC and BCL2 blocking cell growth and survival in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e872.

[7] Rho SB, Kim BR, Kang S. A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2011, 120(1): 121-7.

[8] Gil-Ad I, Shtaif B, Levkovitz Y, et al. Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines: clinical relevance and possible application for brain-derived tumors[J]. J Mol Neurosci, 2004, 22(3): 189-98.

[9] Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening[J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18(5): 703-10.

[10] Strobl JS, Kirkwood KL, Lantz TK, et al. Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine[J]. Cancer Res, 1990, 50(17): 5399-405.

[11] Strobl JS, Peterson VA. Tamoxifen-resistant human breast cancer cell growth: inhibition by thioridazine, pimozide and the calmodulin antagonist, W-13[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1992, 263(1): 186-93.

[12] Kang S, Dong SM, Kim BR, et al. Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells[J]. Apoptosis, 2012, 17(9): 989-97.

[13] Nagel D, Spranger S, Vincendeau M, et al. Pharmacologic inhibition of MALT1 protease by phenothiazines as a therapeutic approach for the treatment of aggressive ABC-DLBCL[J]. Cancer Cell, 2012, 22(6): 825-37.

[14] Min KJ, Seo BR, Bae YC, et al. Antipsychotic agent thioridazine sensitizes renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive Oxygen species-mediated inhibition of Akt signaling and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP(L)[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1063.

[15] Mu J, Xu H, Yang Y, et al. Thioridazine, an antipsychotic drug, elicits potent antitumor effects in gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 31(5): 2107-14.

[16] Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer[J]. Front Oncol, 2014, 4: 64.

[17] Vara JÁ, Casado E, De Castro J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2004, 30(2): 193-204.

[18] Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression[J]. Cell Cycle, 2003, 2(4): 339-45.

[19] Suzuki C, Garces RG, Edmonds KA, et al. PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its Ma3 domains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(9): 3274-9.

[20] Chang JH, Cho YH, Sohn SY, et al. Crystal structure of the eIF4A-PDCD4 complex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(9): 3148-53.

[21] Hercbergs A. Thioridazine: a radiation enhancer in advanced cervical cancer?[J]. Lancet, 1988, 2(8613): 737.

[22] Gil-Ad I, Shtaif B, Levkovitz Y, et al. Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth[J]. Oncol Rep, 2006, 15(1): 107-12.

[23] Allgayer H. Pdcd4, a colon cancer prognostic that is regulated by a microRNA[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2010, 73(3): 185-91.

(编辑：黄开颜)